

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DIACEREÍNA VÍA
INTRAARTICULAR EN UN MODELO DE OSTEOARTROSIS DE RODILLA”**

Por

DR. CARLO ARTURO RIVERA COMPEÁN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ORTOPEDIA Y TRAUMATOLOGÍA**

FEBRERO, 2018

**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DIACEREÍNA VÍA
INTRAARTICULAR EN UN MODELO DE OSTEOARTROSIS DE
RODILLA”**

Aprobación de la tesis:

**Dr. en C. Jorge Lara Arias
Director de la tesis**

**Dr. Santiago de la Garza Castro
Coordinador de Enseñanza**

**Dr. Med. Carlos Alberto Acosta Olivo
Coordinador de Investigación**

**Dr. Med. Victor Manuel Peña Martínez
Jefe de Servicio o Departamento**

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado**

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

Con la conclusión de esta tesis también finaliza mi residencia en la especialidad de Ortopedia y Traumatología, logrando un objetivo más en mi carrera profesional y a la vez iniciando una nueva etapa en la misma.

Agradezco a mi alma mater la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” mismo que me forjó como médico y ahora como especialista.

Me siento agradecido con todas aquellas personas que formaron parte fundamental de mi enseñanza, a mi jefe de servicio Dr. Med. Víctor Manuel Peña Martínez, quien me acogió en la Ortopedia y Traumatología. Así mismo me encuentro en gratitud con mi maestro el Dr. Marco Antonio Ascacio Solís quien me inspiró a querer formar parte de esta familia de especialistas y quien sigue siendo base de mis metas. También agradezco a mi director de tesis Dr. en C. Jorge Lara Arias quien me apoyo incondicionalmente durante esta investigación y que gracias a sus consejos y enseñanzas finalizamos con éxito nuestro proyecto.

Por último y no menos importante agradezco a mis compañeros mismos que se volvieron mis amigos durante cuatro años de camino y que espero continúe nuestra amistad.

Dedico este proyecto a mis padres, quienes además de ser cimientos de mi formación, por sobre todas las cosas siempre estuvieron pendientes de mis altibajos y necesidades, de igual modo a mi hermana que me ha escuchado y me ha otorgado parte de su experiencia.

En especial dedico esta tesis a mi esposa con quien ahora emprenderé mis proyectos profesionales y personales y que a su lado encontré la fortaleza para crear y cumplir metas, desafíos y con ella mejorar en todos los ámbitos desde el núcleo de nuestra nueva familia.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
RESÚMEN	1
Capítulo II	
INTRODUCCIÓN	3
Capítulo III	
JUSTIFICACIÓN	12
Capítulo IV	
HIPÓTESIS	13
Capítulo V	
OBJETIVOS	14
Capítulo VI	
MATERIAL Y MÉTODOS	16
Capítulo VII	
RESULTADOS	24
Capítulo VIII	
DISCUSIÓN	36

Capítulo IX

CONCLUSIÓN	40
------------------	----

Capítulo X

PERSPECTIVAS	42
--------------------	----

Capítulo XI

BIBLIOGRAFIA.....	43
-------------------	----

Capítulo XII

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO.....	47
-----------------------------	----

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1.Escala de Yoshioka para la evaluación morfológica del cartílago articular....	21
2. Escala de Mankin para la evaluación microscópica del cartílago.	22
3. Solubilidad de la diaceréina en PBS y DMSO.	27
4. Solubilidad de la réina en PBS y DMSO.	28
5. Resultados de la valoración macroscópica a través de la escala de Yoshioka.	31
6. Solubilidad de réina en diferentes vehículos.	34

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Composición y arreglo del cartílago articular hialino	5
2. Curva de calibración de la diacereína	26
3. Disolución de la diacereína.	27
4. Disolución de la reína. Método de agitación durante 24 horas en DMSO y PBS.	28
5. Efecto de la diacereína sobre la citotoxicidad.	30
6. Microfotografías de cortes histológicos de rodillas de los diferentes grupos sujetos a estudio.	32
7. Dilución de la reína. Comparación entre la dilución de la diacereína en diferentes vehículos.	33
8. Cromatogramas de la reína. Identificación de los metabolitos por medio de HPLC.	35

LISTA DE ABREVIATURAS

E.E.U.U.: Estados Unidos

MEC: Matriz extra celular

AP: Anteroposterior

OA: Osteoartrosis

AINE: Antiinflamatorio no esteroideo

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante beta 1

OCDE: Organización para la cooperación y el desarrollo económicos

PBS: Tampón fosfato salino

DMSO: Dimetil sulfóxido

Capítulo I

Resumen

La osteoartrosis es la más común de las patologías degenerativas del cartílago articular de origen multifactorial y es la mayor causa de discapacidad en adultos mayores de 70 años en E.E.U.U. afectando aproximadamente a 27 millones de estadounidenses.(1).

Esta patología degenerativa puede afectar cualquier articulación siendo más común en áreas de carga como en rodillas, caderas, etc. Es diagnosticada primariamente por clínica como el dolor difuso, rangos de movimientos disminuidos, crepitantes, deformidad, inestabilidad articular, etc. No solo envuelve el cartílago articular sino la articulación completa incluyendo hueso subcondral y sinovial.

En nuestro trabajo se pretende analizar los cambios macroscópicos así como histológicos que se generen por la diacereína administrada de manera intraarticular teniendo como hipótesis que su uso por esta vía generaran cambios favorables tanto macroscópicos como histológicos en el cartílago articular, hueso subcondral y membrana sinovial.

El estudio es experimental en modelo animal, transversal, comparativo, prospectivo y ciego respecto al evaluador.

Se creó un modelo de artrosis en rodillas de conejos, se encontró la dosis adecuada de diacereína en ensayos de citotoxicidad, se infiltraron con la misma y se tomaron biopsias de cartílago para valorar los cambios tanto microscópicos como histológicos.

En los resultados obtenidos se observó en las rodillas infiltradas con diacereína un alto a la progresión de la artrosis sin embargo no se revirtió el daño.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

El cartílago articular

El cartílago es un tipo de tejido conectivo cuya función es proteger los huesos de las articulaciones diartrodiales de las fuerzas de fricción asociadas con el soporte de carga e impacto.(1,2) El cartílago hialino o articular es heterólogo, con una densidad y organización que varía según la profundidad de sus zonas⁸, es predominantemente avascular, aneural y alinfático⁹, por lo que su principal forma de nutrirse es a través del líquido sinovial, ayudado por fuerzas mecánicas de compresión.

El cartílago articular forma una capa delgada de tejido, que varía en espesor dependiendo de la localización en el cuerpo. En los seres humanos varía de 1 a 4 mm, dependiendo de la articulación. (2) Este tejido tiene capacidad visco-

elástica, dándole la característica de deformarse para aumentar el área de superficie total de contacto con el fin de reducir el estrés, y aumentar la resistencia a los daños causados por las cargas aplicadas. Esta función depende de la organización de sus macromoléculas en la matriz extracelular, particularmente de la disposición y orientación de las fibras de colágeno. (3)

Una característica importante del cartílago que ayuda al soporte de cargas es su coeficiente de fricción (0.002-0.02), el cual depende de muchos factores que lo disminuyen, como la calidad del líquido sinovial, la deformación elástica del cartílago y efusión del líquido desde el cartílago; también existen factores que aumentan el coeficiente de fricción, como alteración en la superficie del cartílago (fibrilación). (4)

En el cartílago hialino se pueden distinguir dos fases: una sólida y una líquida. La sólida está compuesta principalmente por distintos colágenos (10-20% de peso húmedo) siendo el colágeno II el que se encuentra en mayor proporción (90%). También se encuentran proteoglicanos formando una matriz gelatinosa y en alrededor de 2%, condrocitos que son las células propias de este tejido. Los condrocitos están incluidos en lagunas en el seno de la matriz y son células esféricas. La fase líquida está compuesta por agua en la cual se encuentran iones y nutrientes disueltos. Cualquier alteración al arreglo o proporción de los componentes de la matriz extracelular modifica de forma importante las propiedades biomecánicas del tejido. (5)

El arreglo estructural de los componentes bioquímicos del cartílago articular es particular y determina tres zonas con características morfológicas y funcionales

diferentes: zona superficial, zona media y zona interna. Éstas se distribuyen a lo largo del tejido como se muestra en la Figura 1.

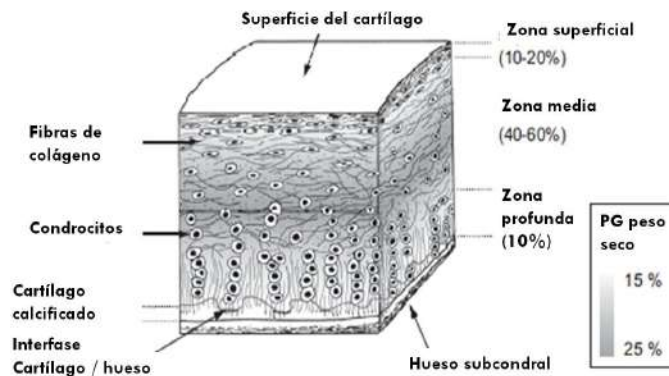


Figura 1. Composición y arreglo del cartílago articular hialino. Se muestran 3 zonas que consisten de diferentes componentes en distintos arreglos, lo cual, les brinda funciones determinadas. Adaptada de Buckwalter y col., 1994.

Se pueden identificar condrocitos con morfología y distribución diferente para las tres zonas, así como cambios en la orientación de las fibras de colágeno y en la proporción de proteoglicanos. Es importante mencionar que es el movimiento de compresión derivado de la carga a la que están sujetas las articulaciones, el que mantiene sano el cartílago y el fenotipo normal de los condrocitos que lo componen.

Una característica importante de este tejido es que es aneural, avascular y alinfático. El transporte de nutrientes y desechos se hace a través de difusión del líquido sinovial que a su vez es producto de la compresión mecánica de las articulaciones. Además de lo anterior, la capacidad de remodelación de este tejido es muy baja, ya que los condrocitos son células con un metabolismo muy bajo y el recambio de los componentes de la matriz cartilaginosa es prácticamente nulo a lo largo de la vida de una persona. Los proteoglicanos

presentes en el cartílago articular se reemplazan cada 25 años y la vida media del colágeno se estima de varias décadas hasta inclusive 400 años. (6) Estas características y la ausencia de vasos sanguíneos y linfáticos, resulta en una limitada capacidad regenerativa.

La degradación del cartílago articular puede surgir de un trauma, enfermedad o carga mecánica continua. Podemos mencionar tres tipos principales de lesión del cartílago: la interrupción de la matriz superficial en la cual se daña la MEC pero se cuenta con condrocitos viables capaces de sintetizar una nueva MEC (2,7) aunque no se tiene acceso a las células de la médula¹⁶; los defectos de espesor parcial en donde se encuentra interrumpida la superficie del cartílago pero no se extiende al hueso subcondrál, por lo que no existe la auto-reparación.(2,7) y los defectos de espesor total, estos representan daños que penetran profundamente en el hueso subcondrál y normalmente se reparan con fibrocartílago, el cual es mas débil que el cartílago.(2,7,8)

La osteoartrosis

Muchas de las lesiones articulares son asintomáticas y los individuos que presentan síntomas por lo general padecen de un intenso dolor y se ha demostrado que el riesgo de estos pacientes con lesión articular de progresar a osteoartritis aumenta 5 veces en comparación con pacientes que no han tenido lesiones en cartílago. (6)

La osteoartrosis es la más común de las patologías degenerativas del cartílago articular de origen multifactorial y es la mayor causa de discapacidad en adultos

mayores de 70 años en E.E.U.U. afectado aproximadamente a 27 millones de estadounidenses. (9)

Esta patología degenerativa puede afectar cualquier articulación siendo más común en áreas de carga como en rodillas, caderas, etc. Es diagnosticada primariamente por clínica como el dolor difuso, rangos de movimientos disminuidos, crepitantes, deformidad, inestabilidad articular, etc. No solo envuelve el cartílago articular sino la articulación completa incluyendo hueso subcondral y sinovial. Entre los factores que envuelven el progreso de este padecimiento se encuentran la edad, peso, trauma, grado actividad física, herencia, debilidad muscular, infección, deposición de cristales, hasta factores propios como variantes anatómicas del paciente. (10)

La patogénesis molecular de la artrosis parece requerir pérdida de agreganos, daño a la colágena y pérdida del fenotipo normal de condrocitos además muerte celular de los mismos. La degradación de los agreganos, el daño y la degradación de la colágena constituyen un paso irreversible en la patogénesis del padecimiento. La erosión del cartílago dañado en una articulación con osteoartrosis puede progresar hasta que el hueso subyacente sea expuesto. El hueso subcondral traumatizado constantemente puede evolucionar a degeneración quística lo que puede ocasionar necrosis secundaria a impactación dando como resultado áreas de esclerosis. La progresión de la enfermedad es lenta desde años hasta décadas teniendo como síntoma inicial y principal el dolor. (11)

Para tener un buen acercamiento diagnóstico de la OA en rodilla además de la exploración física, podemos usar clasificaciones ya establecidas, la más

comúnmente usada es la clasificación de Kellgren-Lawrence establecida en 1957 dividiéndola en 3 grados con respecto al aspecto radiológico:

0 = normal

1 = dudosa disminución del espacio articular y posibles osteofitos pequeños.

2 = osteofitos bien definidos y posible disminución del espacio articular la radiografía AP en apoyo.

3 = múltiples osteofitos, definida disminución del espacio articular, esclerosis, posible deformidad ósea.

4= grandes osteofitos, marcada disminución del espacio articular, severa esclerosis y deformidad ósea definida. (12)

Tratamiento para la OA

El tratamiento debe tener como objetivos primordiales la mejoría del dolor y de la función. Iniciando con el tratamiento de manera más conservadora posible mejorando los factores modificables como la educación del paciente, terapia física, pérdida de peso, disminución de carga a articulaciones. La farmacoterapia es el siguiente paso en tratamiento iniciando con AINE's o corticoides. A pesar de la mejoría de los síntomas con estos medicamentos se trata de un tratamiento paliativo ya que no modifica el curso de la enfermedad, por lo tanto, se debe limitar su uso al dolor ya que los efectos secundarios que estos pueden ocasionar podrían empeorar el estado de salud del paciente. (13)

Tratamientos alternativos para la OA

Actualmente la farmacoterapia en la artrosis es de tipo paliativo; no se ha demostrado que algún medicamento prevenga la enfermedad, retrase su avance o revierta los cambios patológicos de la artrosis. En el tratamiento del dolor por artrosis, los medicamentos se deben utilizar como auxiliares de las medidas no farmacológicas. Estas últimas constituyen la piedra angular del tratamiento de esta enfermedad. El tratamiento oral o parenteral de corticoesteroides debe ser limitado en la OA, ya que los beneficios suelen ser de corta duración, se requiere ir aumentando la dosis y la toxicidad es elevada con el uso crónico. La glucosamina y el sulfato de condroitina han recibido gran atención recientemente para el tratamiento de la artrosis (14). Además de la vía oral y parenteral, los AINE's pueden ser usados de forma tópica. Sin embargo, su efecto analgésico es menor. Existen métodos más invasivos que mejoran el dolor por tiempo más prolongado como la infiltración intraarticular de fármacos como el ketorolaco, los corticoides o concentrados plaquetarios como el Plasma Rico en Plaquetas que ha comprobado tener un efecto analgésico prolongado hasta por 20 semanas. (15) En etapas más avanzadas de la enfermedad en que el tratamiento paliativo no es suficiente, se puede optar por métodos quirúrgicos desde los menos invasivos como la artroscopia, osteotomías correctoras, hasta métodos quirúrgicos definitivos como el reemplazo articular o artroplastía. (16)

Diacereína en OA

Entre las alternativas de los medicamentos orales se encuentran el colágeno hidrolizado y la diacereína. Esta última, es un derivado del aloe vera y está siendo ampliamente usada por vía oral ya que además de evitar los efectos adversos de los AINE's los pacientes refieren mejoría del dolor con su uso

continuo y se encuentra aún en investigación su posible efecto sobre la modificación o el retraso en la evolución del daño al cartílago articular. (13)

(17) La reína (1,8-dihidroxi-3-carboxiantraquinona), es un metabolito de diacereína, que ha demostrado reducir la gravedad de la OA humana y la evolución de la OA en modelos animales. La reína, no puede inhibir la producción de prostaglandina E2 a partir de condrocitos articulares. Sin embargo, la droga exhibe algunos efectos antiinflamatorios y propiedades condroprotectoras. *In vitro*, la diacereína y reína son capaces de inhibir la estimulación de collagenasa inducida por la expresión de IL-1b en condrocitos de conejos, mientras que aumentan la síntesis de colágeno y proteoglicanos. La diacereína y la reína, también estimulan la expresión del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-b1) en condrocitos, un efecto que puede ser benéfico para el cartílago articular debido a TGF-b1 contrarresta la expresión de MMP inducida por IL-1b. De tal manera que la eficacia de la diacereína se atribuye a la regulación negativa de las vías inflamatorias inducidas por la IL-1b, principalmente involucrada en la destrucción del cartílago, lo que suprime la descomposición de la matriz del cartílago. A nivel de expresión génica, la diacereína aumenta la expresión del inhibidor tisular de la producción de metaloproteinasas-1 (TIMP-1). Además, la diacereína antagoniza las cascadas de señalización de la proteína MAPK quinasa MAPK, activada por IL-1b de los condrocitos articulares.

Modelo de OA animal

Los modelos animales son una herramienta importante para estudiar la etiología y patogenia en muchas enfermedades. Permiten realizar estudios experimentales que no es posible llevarlos a cabo en los seres humanos por

razones éticas y metodológicas. Los conocimientos que se tienen respecto a la fisiopatología de la OA humana se basan en gran parte en la experimentación previa en modelos animales. Además, estos forman la primera fase de los ensayos de fármacos *In Vivo*. Los modelos animales son especialmente relevantes en el estudio de la osteoartrosis. Actualmente, existen modelos bastante homologados y estandarizados para el estudio de esta enfermedad. Es importante tener en cuenta que cada modelo tiene sus propias ventajas y limitaciones y la interpretación de los resultados tampoco debe ir más allá de las limitaciones impuestas por el propio modelo en estudio. Los modelos experimentales de osteoartrosis ofrecen claras ventajas sobre la investigación en humanos. En ellos puede determinarse con precisión el comienzo y la duración de la enfermedad, así como su gravedad y progresión en el tiempo. Estas cualidades permiten hacer estudios secuenciales de la enfermedad, cuantificar y calificar con rigor los cambios patológicos encontrados. Para ello es imprescindible que cualquier modelo experimental de osteoartrosis reproduzca razonablemente la enfermedad como se desarrollaría en el paciente; además de tener características como disponibilidad del espécimen, bajo costo y facilidad de manejo para el estudio. Actualmente se han descrito diversos modelos de artrosis en animales, dentro de los cuales existen modelos de artrosis experimental por agresión química, la cual se basa en la inyección intraarticular de sustancias irritantes, la administración intraarticular de enzimas proteolíticas, como papaína, tripsina o colagenasa, desencadenando una artrosis por degradación química de las proteínas de la matriz extracelular.

CAPITULO III

JUSTIFICACIÓN

La osteoartrosis es la más común de las patologías degenerativas del cartílago articular de origen multifactorial y es la mayor causa de discapacidad en adultos mayores de 70 años. A pesar de que existen múltiples tratamientos para esta enfermedad, ninguno ha demostrado una completa efectividad.

Se ha reportado que la diacereína en procesos de osteoartrosis tiene un efecto analgésico por vía oral. Sin embargo, hasta el momento no existe ningún reporte del uso de este fármaco por vía intraarticular, por este motivo, el presente estudio pretende analizar los cambios macroscópicos e histológicos del efecto de la diacereína administrada como tratamiento en un modelo de OA de rodilla en conejos.

CAPÍTULO IV

4. HIPÓTESIS

El uso de diacereína intraarticular en modelo de osteoartrosis en conejos produce cambios favorables tanto macroscópicos como histológicos en el cartílago articular, hueso subcondral y membrana sinovial.

CAPÍTULO V

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de la diacereína administrada de manera intraarticular en conejos con osteoartrosis química en ambas rodillas.

Objetivos particulares

1. Determinar la dosis terapéutica de la diacereína en cultivos celulares.
2. Reproducir la lesión de osteoartrosis de rodilla en conejos de la raza Nueva Zelanda.
3. Infiltrar la dosis terapéutica de diacereína en las rodillas derechas de los conejos sujetos de estudio.

4. Analizar mediante ensayos histológicos el efecto de la diacereína sobre el hueso subcondral, el cartílago articular y membrana sinovial de los conejos sujetos de estudio.

CAPÍTULO VI

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño metodológico del estudio

El presente trabajo es un estudio experimental en modelo animal, transversal, comparativo, prospectivo y ciego respecto al evaluador.

Descripción del diseño

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética y el Comité de investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León con registro OR17-007.

Debido a que el uso recomendado de la diacereína por vía oral es de 100mg al día, se realizaron ensayos de citotoxicidad celular para determinar la dosis adecuada para la infiltración de la diacereína en un modelo de osteoartritis de rodilla. Para la selección del número de animales a emplear, decidimos apoyarnos en el método Charan para establecer el tamaño de muestra. (18)

Se consideró un valor de nivel de confianza de 95%.

En donde:

$E = \text{Número total de animales} - \text{Número total de grupos}.$

Que considera un valor de tamaño de muestra adecuado entre 10 y 20 animales, por tal motivo nuestra muestra fue:

$5 \text{ animales} \times 3 \text{ grupos} = 15 \text{ animales totales}$

$E = 15 \text{ animales totales} - 3 \text{ grupos} = 12 \text{ animales}$, que de acuerdo a Charan, se considera un número de muestra adecuado.

Por lo tanto:

Se utilizaron 15 conejos machos de 3 meses de edad promedio y de 2.5kg promedio. Se realizaron estudios histológicos para observar los cambios en el cartílago articular estimulados por la diacereína infiltrada.

Los grupos fueron distribuidos de la siguiente manera:

Grupo 1.

Infiltración de 0.25ml de diacereína, sacrificado a 4 semana de la inyección.

Grupo 2.

Infiltración de 0.25ml de diacereína, sacrificado a las 8 semanas de la inyección

Grupo 3.

Infiltración de 0.25ml de diacereína, sacrificado a las 12 semanas de la inyección.

Solubilidad de la diacereína

Se realizaron pruebas para determinar la solubilidad de la diacereína en diferentes solventes y mezclas de ellos, con la finalidad de encontrar el solvente más adecuado para su disolución y su posterior aplicación. Para la determinación de la solubilidad, se tomó como base el “Flask method” recomendado por la OCDE (10). Una vez determinado el solvente adecuado y los resultados obtenidos durante la determinación de la solubilidad de la diacereína se prepararon soluciones a diferentes concentraciones de dicho compuesto para determinar la citotoxicidad de las mismas en cultivos celular primarios (0.5%, 1% y 2%).

Dosis terapéutica

Para los ensayos de citotoxicidad se utilizó la línea celular HeLa y se hizo el ensayo de reducción del MTT (Thermo Fisher Scientific Inc), para estimar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables. El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. El período de exposición a la diacereína fue de 48 hrs. La D.O., se midió

utilizando un filtro de 620 nm como referencia. Se realizaron al menos 3 réplicas de cada concentración a evaluar.

Modelo de osteoartrosis química.

Se realizó en un modelo establecido por Kikuchi y colaboradores (1998) en rodillas de conejos (19). Con uso de batas quirúrgicas, cubre bocas, guantes y gafas, previa asepsia y antisepsia, rasurado del área y con campos estériles, a cada conejo se le aplicó una inyección intramuscular de Xilacina 3 mg/Kg y Ketamina 46 mg/Kg. Posterior a la sedación, se trataron ambas rodillas con una infiltración de 250 µl de colagenasa tipo II (*Clostridium histolyticum* tipo II, enzima activa 425U/mg, SIGMA ALDRICH) a una concentración de 4 mg/ml para establecer una osteoartrosis leve de acuerdo al método estandarizado. El día de la primera infiltración con colagenasa se establece como día 1 y una segunda infiltración fue realizada al día 4. Es importante señalar, que el procedimiento consistió en una infiltración articular, por lo que el tiempo requerido de anestesia fue muy corto. Sin embargo, se realizó un monitoreo básico del animal durante la anestesia que incluye la frecuencia cardíaca (129-180 lpm), frecuencia respiratoria (50-60 rpm), tiempo de llenado capilar y coloración de mucosas. Los conejos se mantuvieron durante 3 semanas en el bioterio de Fisiología de la facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León hasta que se obtuvo los modelos de osteoartrosis leve. Es muy importante el manejo del dolor en los conejos posterior a la infiltración de la colagenasa tipo II, debido a que los estados de dolor desencadenan la liberación de catecolaminas, que dan lugar a un aumento de la contractibilidad y frecuencia cardíaca, taquicardia, vasoconstricción periférica que aumentan la presión arterial. Si el dolor se

mantiene por períodos prolongados, pueden producirse estados de shock neurogénico.

Como analgesia para manejo del dolor, se administró por vía oral, meloxicam a una dosis de 0.6 mg/kg de peso. Se monitorearon los signos y síntomas para identificar el dolor en los animales como el lamerse en las rodillas, vocalizar, evitar saltar o estar indiferentes al manejo.

Infiltración articular de la diacereína

Una vez establecidos los modelos de osteoartrosis leve en ambas rodillas de todos los conejos, se infiltró a cada conejo la cantidad establecida de diacereína en la rodilla derecha, dividiendo a estos en 3 grupos, de 5 animales cada uno.

A cada conejo se le realizó una infiltración articular de la rodilla derecha con la sustancia en estudio y se realizó infiltración de la rodilla izquierda con solución salina (0.25ml) que se utilizó como grupo control.

Grupo 1.

Infiltración de 0.25ml de diacereína, sacrificado a 4 semana de la inyección.

Grupo 2.

Infiltración de 0.25ml de diacereína, sacrificado a las 8 semanas de la inyección.

Grupo 3.

Infiltración de 0.25ml de diacereína, sacrificado a las 12 semanas de la inyección.

Todos los procedimientos fueron realizados bajo anestesia general con Xilacina y Ketamina. Todas las rodillas fueron infiltradas por el mismo investigador. Los

conejos se mantuvieron en el Bioterio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con los cuidados higiénicos y dietéticos generales. No se detectó ningún animal enfermo durante el ensayo.

Obtención de las muestras a estudiar

Una vez concluido el periodo de tiempo de exposición a las sustancias en estudio, se realizó la eutanasia de los animales con Pentobarbital sódico IV y se revisaron signos vitales como latido del corazón y respiración. Posteriormente, se realizó la disección y resección en bloque de ambas rodillas de todos los conejos. Los bloques de cada rodilla se colocaron dentro de una solución con paraformaldehído al 4% para su conservación. Todas las muestras, previamente identificadas, fueron enviadas para su estudio histológico al departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Una vez concluida la toma de muestras, el cadáver fue colocado en una bolsa amarilla y el cadáver fue incinerado de acuerdo a los protocolos establecidos dentro del Bioterio de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Análisis morfológico e histológico

El análisis morfológico se realizó mediante la escala publicada por Yoshioka y cols (20). En la cual el grado 1 indica superficie articular intacta; grado 2, mínima fibrilación; grado 3, fibrilación evidente y grado 4, erosión con exposición de hueso. (Tabla 1).

Tabla 1. Escala de Yoshioka para la evaluación morfológica del cartílago articular

Grado	Descripción
1	Superficie articular intacta
2	Mínima fibrilación
3	Fibrilación evidente
4	Erosión con exposición de hueso

Las muestras de ambas rodillas de cada conejo fueron fijadas, decalcificadas y embebidas en bloques de parafina. Se realizaron cortes sagitales de 4 micrómetros, se tiñeron con Hematoxilina y Eosina para su valoración estructural, celularidad e integridad del “tidemark”.

Se utilizó la escala propuesta por Mankin y cols (21). En ella se asigna una puntuación histológica a cada caso, resultado de sumar los valores correspondientes a las alteraciones en la estructura del cartílago, en su celularidad, en la tinción de la matriz y en el “tidemark” o línea limitante basófila. De este modo, al cartílago normal le corresponden 0 puntos, y a la afectación más grave del cartílago le corresponderían 14 puntos (Tabla 3). La escala de Mankin ha demostrado buena correlación inter e intraobservador, refleja adecuadamente el nivel de alteración metabólica condrocitaria y constituye el “Gold Standard” para la evaluación histopatológica del cartílago hialino articular. La evaluación y graduación morfológica e histopatológica fue realizada por un observador independiente que no conocía a qué grupo pertenecía cada muestra.

Tabla 2. Escala de Mankin para la evaluación microscópica del cartílago.

SUBESCALAS	ALTERACIONES	PUNTUACIÓN
ESTRUCTURA	Normal	0
	Irregularidades en la superficie	1
	Irregularidades en la superficie y pannus	2
	Hendiduras hasta zona de transición	3
	Hendiduras hasta zona radial	4
	Hendiduras hasta zona calcificada	5
	Desorganización completa	6
CELULARIDAD	Normal	0
	Hiper celularidad Difusa	1
	Presencia de clones	2
	Hipocelularidad	3
TINCIÓN DE LA MATRIZ	Normal	0
	Reducción leve	1
	Reducción moderada	2
	Reducción severa	3
	Ausencia de tinción	4
INTEGRIDAD DE TIDEMARK	Intacta	0
	Invasión de vasos	1

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el programa Prisma 6.0. Para los ensayos de viabilidad celular los datos fueron analizados mediante una prueba T de Student. Los datos de la evaluación histológica fueron analizados mediante una prueba de Wilcoxon para variables no paramétricas. Los datos fueron presentados como promedio \pm error estándar, a excepción de la evaluación histológica donde se graficó la sumatoria de los parámetros evaluados. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

CAPÍTULO VII

RESULTADOS

Pruebas de solubilidad

Se realizaron pruebas de solubilidad siguiendo lo establecido por OCDE en el “método del matraz (flask method)”. Una solución saturada del fármaco se dejó en agitación constante durante 24 h a 25°C, finalmente se centrifugaron a 3500 rpm a 25°C durante 5 min, para finalmente separar la solución del sólido no disuelto.

Los solventes estudiados fueron PBS y DMSO (0.5, 1 y 2 %).

Método de cuantificación de la diacereína

Para la cuantificación de la diacereína se desarrolló un método de HPLC (Cromatografía de alta resolución), empleando un cromatógrafo HP 1100 con detector de longitud de onda variable.

Se optimizaron las condiciones de trabajo, teniendo como condiciones óptimas las siguientes:

Columna: XDB-C₈ 2.1 x 100 mm, 3.5µm

Fase móvil: Buffer de formiatos 40 mM, pH 4 : Metanol (40:60)

Flujo: 0.2 mL/min

Temperatura de columna: 40°C

Longitud de onda de detección: 258 nm

El método desarrollado fue validado considerando las recomendaciones de la ICH. Los parámetros evaluados fueron linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

Para la validación del método se preparó una solución concentrada de la diacereína de 200 µg/mL en una mezcla de buffer de amonio/amoniaco 100 mM a pH 9 y metanol (60:40); a partir de esta se prepararon las soluciones de trabajo en un rango de 0.25 a 16 µg/mL en la misma mezcla de solventes.

- Linealidad

Para la construcción de las curvas de calibración por estándar externo, se prepararon estándares de ambos productos a 7 niveles de concentración (0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µg/mL) por triplicado. Para establecer la relación entre el área de la señal cromatográfica y la concentración del analito, se realizó un análisis de regresión lineal, se obtuvo la ecuación de la recta y se evaluaron los coeficientes de correlación y determinación (r y r^2). Ambos coeficientes fueron superiores a 0.998 por lo cual podemos decir que nuestro método es lineal.

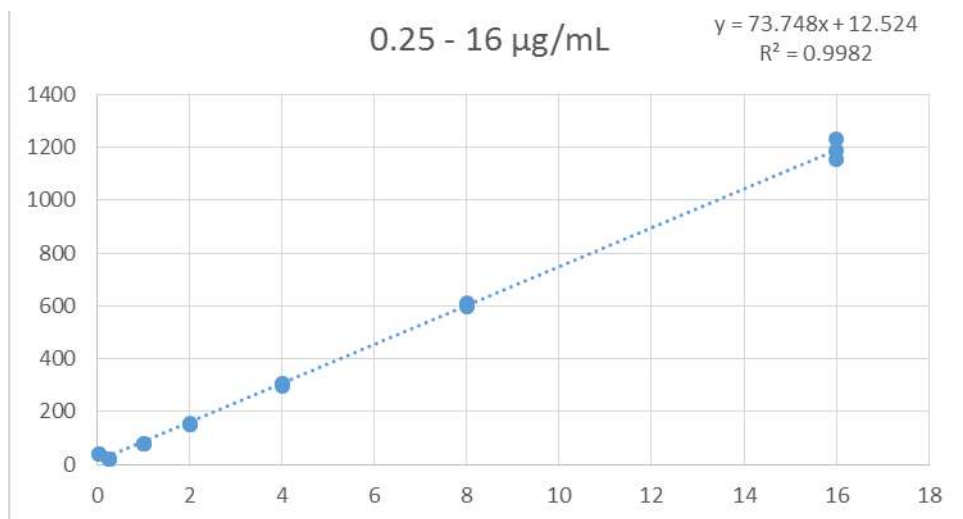


Figura 2. Curva de calibración de la diacereína

- Precisión

La precisión fue evaluada calculando el porcentaje de desviación estándar relativa de la respuesta de los estándares. Teniendo un rango de 1.09 – 3.33 %DER por lo que podemos decir que el método es preciso.

- Exactitud

Se evaluó analizando la correlación entre la concentración calculada para los estándares de calibración y su concentración real. Para ello, se calculó la concentración de los estándares utilizando la ecuación de la recta obtenida para la curva de calibración y se realizó un análisis de regresión por mínimos cuadrados, evaluando los coeficientes de correlación y determinación así como el valor de la pendiente de la recta. El valor de $r^2 > 0.99$ y el valor de la pendiente (m) fue semejante a 1. Por lo cual podemos concluir que el método es exacto.

Resultados de la solubilidad

Desde el inicio de los ensayos, se detectó que la dicereína no se solubilizaba con facilidad. Se intentaron varios métodos, así como la utilización de diferentes solventes en agitación (Figura 3). Se utilizaron diferentes concentraciones de PBS y dicereína para determinar cuál ofrecía mayor solubilidad (0.5%, 1% y 2%). Se encontró que el DMSO al 2% ofrecía mayor solubilidad a la dicereína, incluso este resultado fue mejor en comparación al PBS (Tabla 4).



Figura 3. Disolución de la dicereína. Método de agitación durante 24 horas en DMSO y PBS.

Tabla 3. Solubilidad de la dicereína en PBS y DMSO.

Dicereína		
Solvente	Solubilidad mg/mL	%DER
PBS	0.0143	55.5
DMSO 1%	0.0186	25.5
DMSO 1%	0.0216	18.13
DMSA 2%	0.0234	19.46

Al inicio del estudio, únicamente se contaba con la diacereína, amablemente donada por los laboratorios MEGAFARMA SA de CV. Semanas después de haber iniciado los ensayos *In vivo*, la misma empresa nos donó reína, metabolito activo de la diacereína. Por cuestiones de tiempo, ya no pudimos agregar un grupo experimental más al estudio. Sin embargo, decidimos realizar los mismos ensayos de solubilidad e *In vitro* para este metabolito (Figura 4 y Tabla 5).

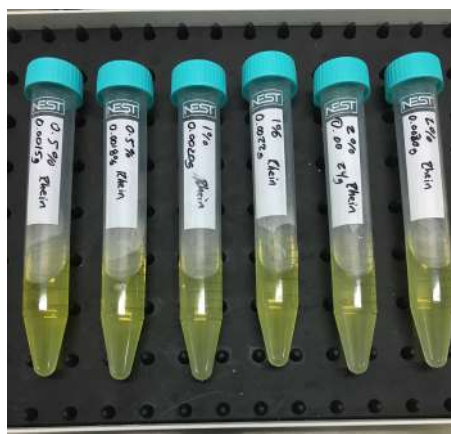


Figura 4. Disolución de la reína. Método de agitación durante 24 horas en DMSO y PBS.

Tabla 4. Solubilidad de la reína en PBS y DMSO.

Reína		
Solvente	Solubilidad mg/mL	%DER
PBS	0.0253	58.6
DMSO 0.5%	0.0346	36.34
DMSO 1%	0.0421	28.17
DMSO 2%	0.0486	23.03

Encontramos que la reína tiene mayor solubilidad que la diacereína en DMSO al 2%. Sin embargo, ninguno de estas dos sustancias, pudieron disolverse al 100%.

Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de reducción de MTT se usó como un índice cualitativo de viabilidad celular. Las deshidrogenasas mitocondriales y citosólicas de las células vivas reducen la sal amarilla de tetrazolio (MTT) para producir un tinte formazan púrpura que puede detectarse espectrofotométricamente. Las células se trataron con diferentes concentraciones de diacereína, se enjuagaron una vez y se incubaron con suero medio libre que contiene 0,4 mg/ml de MTT.

Se sembraron 5×10^3 células en una placa de 96 pozos. Después de 2 horas, se aspiró la solución de MTT y se añadieron las sustancias sujetas de estudio por triplicado. La placa fue agitada suavemente durante 10 minutos para lograr una distribución completa de las soluciones. Las densidades ópticas del sobrenadante se leyeron a 570nm usando un espectrofotómetro de microplacas (Spectra Max 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las absorbancias se normalizaron con respecto a los cultivos de control no tratados para calcular los cambios en la viabilidad celular, en donde únicamente se crecieron las células en medio DMEM con antibiótico y 10% de SBF. Para calcular el porcentaje de viabilidad celular, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{absorbancia en la muestra}}{\text{absorbancia del control}} \times 100$$

Pudimos observar que no existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al porcentaje a utilizar 0.05% y 1% de DMSO (Figura 5). Sin embargo, existe una ligera tendencia, aunque no significativa, de disminución en la

viabilidad celular utilizando 2% de DMSO como disolvente. Debido a estos resultados, decidimos infiltrar la diacereína/DMSO 1%.

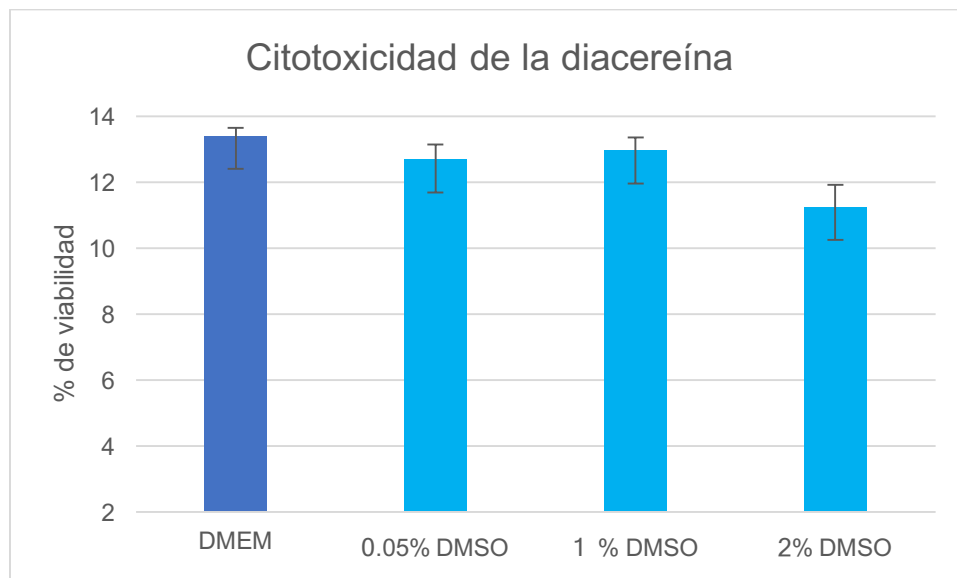


Figura 5. Efecto de la diacereína sobre la citotoxicidad. Las células HeLa se trataron durante 48 h en DMEM/10% SBF y con diacereína/DMSO (0,05%, 1%, 2%, respectivamente). Los datos son medias y su respectiva desviación estándar para muestras por triplicado. La significancia estadística de la diferencia entre las células control en DMEM y las células tratadas se determinó usando la prueba t de Student ($p < 0.05$).

Evaluación macroscópica

Las rodillas izquierdas fueron el grupo control de lesión, mientras que las rodillas derechas fueron sometida al tratamiento con diacereína. Las rodillas izquierdas de los tres grupos, en las cuales se dejó progresar la lesión, se observaron erosiones evidentes con datos de fibrilación y en algunos casos se pudo observar el hueso subcondral en los cóndilos femorales así como en los platillos tibiales, es importante señalar que en la evaluación macroscópica por la escala de

Yoshioka (Tabla 5), este grupo control se acercó más a un puntaje de 4, lo que demuestra que la articulación presenta una artrosis establecida ($P=0.025$).

Tomando en cuenta los grupos establecidos (Grupo 1, 4 semanas. Grupo 2, 8 semanas y grupo 3, 12 semanas), en las rodillas derechas (diacereína), para el grupo 2, encontramos que el cartílago articular obtuvo una puntuación mayor en comparación con el grupo 1 con una diferencia estadísticamente significativa ($P=0.010$). En cambio, no hubo una diferencia entre los grupos 2 y 3. En general, se observó una superficie lisa y con mucho menor erosión y fibrilación.

Tabla 5. Resultados de la valoración macroscópica a través de la escala de Yoshioka.

Grupo	Rodilla	
	Izquierda	Rodilla Derecha
1 (4 semanas)	3.75 \pm 0.71	2.45 \pm 0.76
2 (8 semanas)	3.75 \pm 0.46	2.13 \pm 0.35
3 (12 semanas)	3.50 \pm 0.35	2.86 \pm 0.49

Evaluación histológica

Las rodillas izquierdas de todos los grupos, mostraron hendiduras, así como fibrilación en la superficie articular. Sin embargo, las rodillas derechas a las cuales se les administró diacereína, a pesar que entre el grupo 1 y 2 no mostraban datos de fibrilación, se observó hiper celularidad que es un indicador de una atrofia, así como pérdida de la congruencia entre las diferentes zonas del cartílago articular (Figura 6).

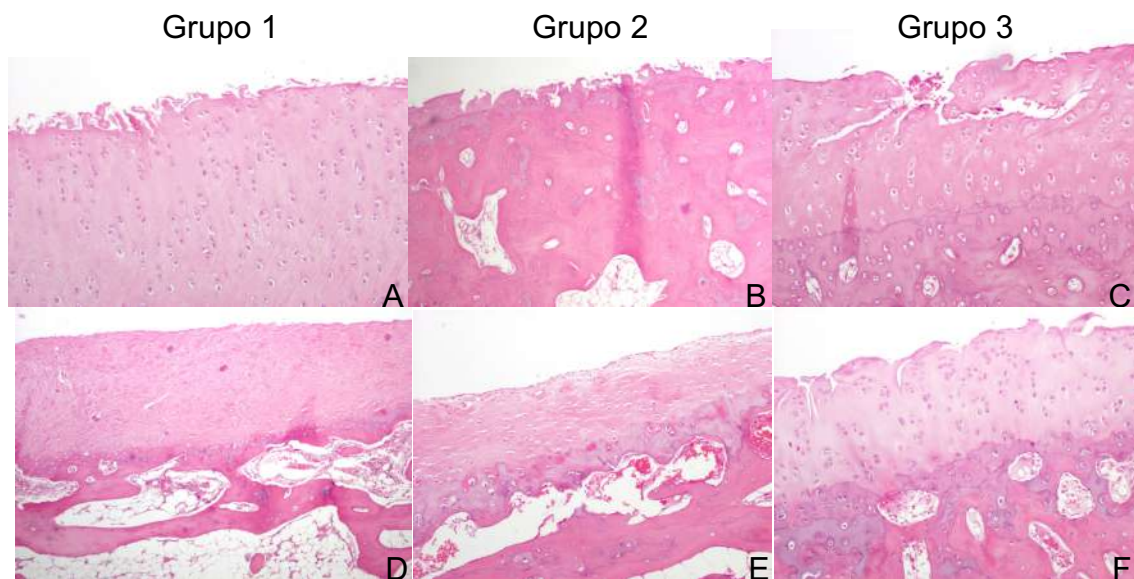


Figura 6. Microfotografías de cortes histológicos de rodillas de los diferentes grupos sujetos a estudio. En la imagen A y D) Grupo 1 se observa fibrilación en la superficie articular y datos de hiper celularidad en la rodilla derecha respectivamente. B y E) Grupo 2, se observa el cartílago articular agrietado y pérdida de la congruencia del cartílago. Sin embargo, también existen datos de hiper celularidad en la rodilla derecha. C y F) Grupo 3 se observa hiper celularidad y pérdida de la estructura, muy similar a lo encontrado en la rodilla derecha. Tinciones con H&E, objetivo 5x.

La Escala Mankin evalúa rasgos del cartílago tratado valorándolos con un puntaje que va del 0 al 6, siendo 0 el peor resultado y 6 un tejido similar al cartílago hialino. A partir de las observaciones de tres técnicos diferentes y de forma independiente, se determinaron los puntajes para cada variable y se aplicó la prueba Wilcoxon para datos no paramétricos.

En las rodillas derechas del grupo 1 y 2, encontramos que el cartílago articular, histológicamente, obtuvo mayor puntuación en la escala de Mankin, en

comparación con sus rodillas contralaterales, lo que indicó mayor afección en las que se dejó progresar la lesión, con una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.010$). Los cambios principales se observaron entre los grupos 1 y 3, en donde se observó una franca afección a la estructura, con hendiduras más profundas ($P = 0.011$).

Reína

Como se mencionó anteriormente, se recibió una muestra de reína tiempo después de haber infiltrado a los conejos sujetos de estudio. A pesar de contar con una ligera solubilidad mayor a la diacereína, tampoco se logró el 100% de solubilidad para este metabolito. Sin embargo, en la búsqueda que un medio capaz de diluir estos derivados del *Aloe vera*, se utilizó suero y plasma humano. Observamos que en el suero la reína pudo disolverse en un 95% y que en el plasma en un 80% (Figura 7), por lo que en comparación con el PBS y el DMSO, el suero ofrece una oportunidad para realizar ensayos de viabilidad celular, así como de expresión celular (Tabla 7).

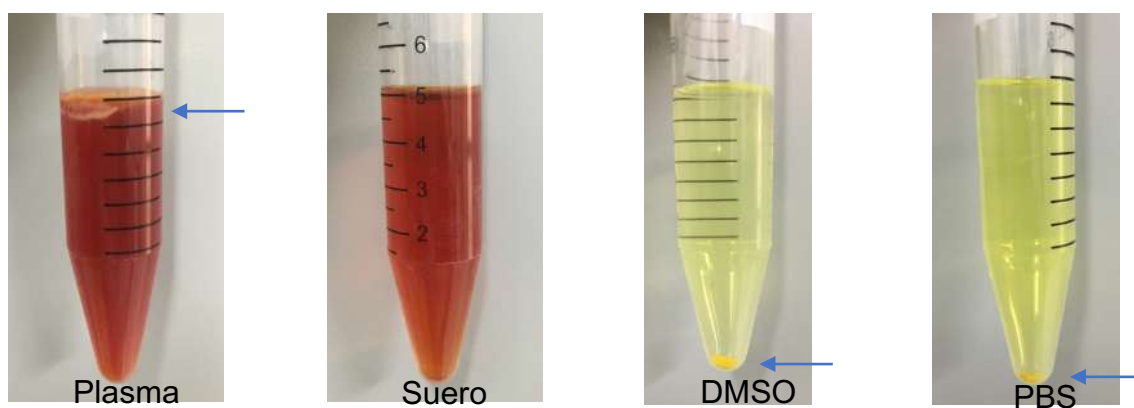


Figura 7. Dilución de la reína. Comparación entre la dilución de la diacereína en diferentes vehículos.

Tabla 6. Solubilidad de reína en diferentes vehículos.

Reína		
Solvente	Solubilidad mg/mL	%DER
PBS	0.0253	58.6
DMSO 1%	0.0421	28.17
Suero	0.975	0.81
Plasma	0.854	0.32

Por medio de cromatografía de alta resolución, se pudo identificar los metabolitos del suero y de la reína, así como una interacción entre las proteínas presentes en el suero con la reína (Figura 8). Al diluir el plasma con la reína, si bien se pudo disolver en un 80%, observamos la formación de una capa de lípidos en la parte superior de la mezcla. Esto sugiere que, en el plasma, la reína interactúa con lipoproteínas, lo que nos hace suponer que esta combinación puede llegar influir de manera negativa en un posible uso y aplicación de la reína de manera intraarticular, aprovechando los factores condroprotectores presentes en el plasma.

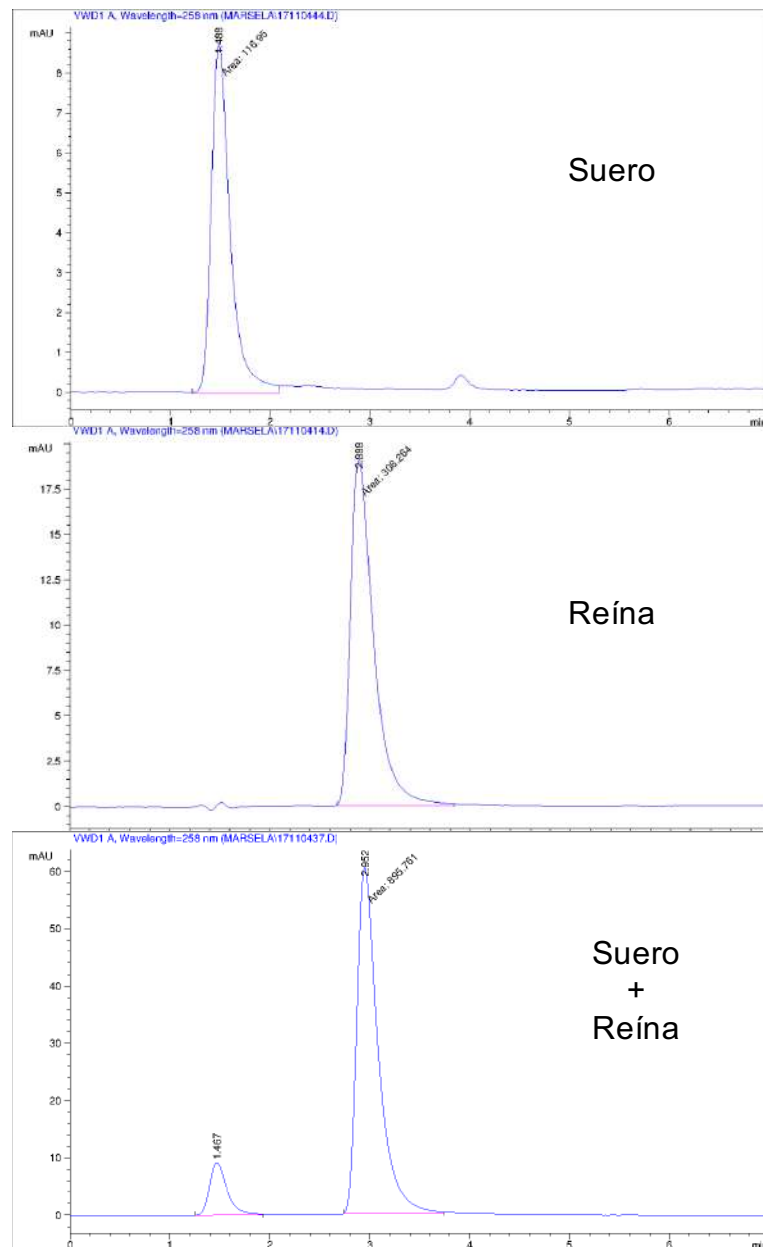


Figura 8. Cromatogramas de la reína. Identificación de los metabolitos por medio de HPLC. Se puede observar un pico nuevo a partir de la interacción entre las proteínas del suero y la reína.

CAPÍTULO VIII

DISCUSIÓN

La OA es el resultado de factores mecánicos y biológicos que desestabilizan el acoplamiento normal entre la degradación y la síntesis por los condrocitos de la matriz extracelular del cartílago articular y del hueso subcondral. La OA puede ser iniciada por múltiples factores entre los que se incluyen factores genéticos, ambientales, metabólicos y traumáticos (22).

Dependiendo de la articulación afectada, los factores son distintos y se puede diferenciar entre una susceptibilidad generalizada, como la edad, peso, densidad mineral ósea, factores nutricionales, herencia, sexo y los factores locales de la articulación, como traumatismos, alteraciones anatómicas de la articulación y la actividad física del paciente (23,24,25).

Este proceso se considera irreversible y actualmente no existe un tratamiento que pueda curar completamente esta patología. Los objetivos se basan en la reducción del dolor, control de la inflamación, disminución de la sobre carga de la articulación y mantener el movimiento adecuado de la misma (23,25).

Actualmente la farmacoterapia en la artrosis es de tipo paliativo; no se ha demostrado que algún medicamento prevenga la enfermedad, retrase su avance o revierta los cambios patológicos de la OA. En el tratamiento del dolor por OA, los medicamentos se deben utilizar como auxiliares de las medidas no farmacológicas. Estas últimas constituyen la piedra angular del tratamiento de esta enfermedad. El tratamiento oral o parenteral de corticoesteroides debe ser limitado en la OA, ya que los beneficios suelen ser de corta duración, se requiere ir aumentando la dosis y la toxicidad es elevada con el uso crónico. La glucosamina y el sulfato de condroitina han recibido gran atención recientemente para el tratamiento de la artrosis (26).

El ejercicio, la pérdida de peso, los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) y las inyecciones intraarticulares con esteroides son métodos comúnmente usados para aliviar el dolor y mejorar la función en pacientes con OA. Sin embargo, estas medidas no siempre son bien toleradas o efectivas. En ausencia de un tratamiento mejor para las etapas tempranas de la enfermedad se han abierto diferentes líneas de investigación con objeto de mejorar los tratamientos antes descritos, y una de tantas líneas de investigación es el uso de ácido hialurónico. La inyección intraarticular de ácido hialurónico ha sido aprobada para el tratamiento de los pacientes con OA de rodilla en los cuales ha fracasado el programa de tratamiento no farmacológico y de analgésicos simples (27).

La diacereína, un derivado semi sintético de la antraquinona, inhibe la interleucina-1-beta (IL-1 β) citocina que, según estudios en animales, desempeña

un papel clave en la patogénesis de la OA. La diacereína fue sintetizada en 1980 y autorizada en algunos países de la Unión Europea y Asia por hasta 20 años. Por vía oral, ha demostrado una eficacia moderada y tolerabilidad aceptable en varios ensayos de calidad baja a moderada. A principios del año 2015, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) realizó una revisión y restringió el uso de medicamentos que contienen diacereína. Esto se debió a las principales preocupaciones sobre la frecuencia y la gravedad de la diarrea y los trastornos hepáticos en pacientes con OA. Además, el Comité de evaluación de riesgos de fármaco-vigilancia (PRAC) de la EMA cuestionó los beneficios clínicos limitados de la diacereína, que, en su opinión, no superaban sus riesgos. En general, existe evidencia de que la diacereína es modestamente efectiva para los síntomas y posiblemente para los cambios radiográficos, pero esto debe equilibrarse con tasas más altas de toxicidad gastrointestinal (28). Sin embargo, en la actualidad no existe un tratamiento que incluya la infiltración intraarticular de diacereína o reína. Para el presente estudio, realizamos revisiones de la literatura y no obtuvimos referencia de estudios *In vitro* con diacereína y menos aún, de algún estudio que se apoye en un modelo animal para evaluar el efecto de este fármaco sobre el cartílago articular. En nuestro estudio, evaluamos el efecto citotóxico de la diacereína en una línea celular, encontrando que no existe una diferencia significativa entre el grupo control (DMEM) y los demás grupos, los cuales se caracterizaron por tener diferentes concentraciones de DMSO como vehículo para la dilución de la diacereína. Al evidenciar una leve disminución de la viabilidad celular, pero no representó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo con 2% de DMSO, decidimos infiltrar diacereína disuelta en un 2% de DMSO, que al momento de cuantificar, representó un 0.2016 mg/ml de diacereína.

Los modelos animales aportan muchas de las claves para mejorar nuestra comprensión sobre la evolución de las lesiones condrales en la OA y la creación de tratamientos que pudieran ser eficaces. Kikuchi y colaboradores (19) establecieron un modelo de OA química fundamentada en la aplicación de colagenasa tipo II. En nuestro estudio, encontramos que en las rodillas en donde se infiltró la diacereína, a los 4 y 8 días post inyección, se observó casi intacta la superficie celular, en comparación con los grupos en donde se dejó progresar la lesión (rodillas izquierdas). Sin embargo, encontramos hiper celularidad en las rodillas que recibieron tratamiento con diacereína, esto indica hipertrofia celular, lo que nos hace suponer que la dosis que se aplicó en este estudio y bajo nuestras condiciones ambientales, probablemente tuvo un efecto que retrasó la progresión de la OA, pero no modificó de manera favorable una reparación del tejido lesionado. A los 12 días post inyección, en las rodillas que recibieron diacereína de manera microscópica, se pudo observar en el peor de los casos, fibrilación en la superficie articular en menor grado que en la rodilla izquierda en donde se reportó erosión del cartílago, grietas evidentes e hiper celularidad.

Legendré *et al*; 2017, (17) estudiaron los efectos de concentraciones farmacológicamente relevantes de reína (1,8-dihidroxi-3-carboxiantraquinona) sobre la tasa de proliferación celular de condrocitos y sinoviocitos humanos. No observaron citotoxicidad del fármaco. Sin embargo, reportaron que la reína inhibe la proliferación de sinoviocitos y condrocitos, lo que sugiere que el fármaco puede disminuir el desarrollo del tejido sinovial inflamatorio que acompaña a las patologías articulares. Tanto sus efectos anti-catabólicos como anti-proliferativos pueden explicar su efecto beneficioso en el tratamiento de enfermedades articulares. En nuestro estudio encontramos que existe una dificultad para disolver la reína. Sin embargo, encontramos que la reína se disuelve casi en un

100% cuando se pone en contacto con el suero y en menor medida cuando se mezcla con el plasma. Debido a que, tanto en el suero, como en el plasma, existen proteínas que pudieran favorecer la condrogénesis, pensamos que es importante realizar estudios para analizar el estímulo positivo que pudiera aportar este tratamiento.

CAPÍTULO IX

CONCLUSIÓN

Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio en donde se infiltra diacereína en un modelo animal con el objetivo de observar los cambios inducidos por este fármaco derivado del *Aloe vera*.

Consideramos que la diacereína tiene un probable efecto condroprotector sobre el cartílago osteoartrósico, debido a que no observamos destrucción generalizada ni pérdida del espesor completo de este tejido entre los grupos sujetos de estudio.

Se necesita mayor tiempo de estudio, así como un disolvente que permita el homogenizado del total de la diacereína.

CAPÍTULO X

PERSPECTIVAS

Debido a que la reína es el metabolito activo de la diacereína y a su potencial como inhibidor de citocinas pro-inflamatorias, consideramos importante analizar el efecto de la reína disuelta en suero o plasma.

También, sugerimos estandarizar las condiciones de disolución entre el suero o plasma con la reína, con el objetivo de disolver en un 100% éste fármaco.

CAPÍTULO XI

BIBLIOGRAFÍA

1. Longo, U. G. *et al.* Stem cells and gene therapy for cartilage repair. *Stem Cells Int.* 2012, 1–9 (2012).
2. Matsiko, A., Levingstone, T. & O'Brien, F. Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair. *Materials (Basel)*. 6, 637–668 (2013).
3. Eyre, D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* 4, 30–35 (2002).
4. Sopena, J., Carrillo, J. & Rubio, M. Estructura y función del cartílago articular. *En Portada/ Armas frente a la Patol. Articul.* 24–26
5. Chung, C. & Burdick, J. a Engineering cartilage tissue. *Advanced drug delivery reviews* 60, 243–62 (2008).
6. Richter, W. Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *Journal of internal medicine* 266, 390–405 (2009).

7. Beris, A. E., Lykissas, M. G., Papageorgiou, C. D. & Georgoulis, A. D. Advances in articular cartilage repair. *Injury* 36, S14–23 (2005).
8. Jadin, K. D. *et al.* Depth-varying density and organization of chondrocytes in immature and mature bovine articular cartilage assessed by 3d imaging and analysis. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 1109–19 (2005).
8. Redman, S. N., Oldfield, S. F. & Archer, C. W. CURRENT STRATEGIES FOR ARTICULAR CARTILAGE REPAIR. *Eur. Cells Mater.* 44, 23–32 (2005).
9. Knight, M., Wang, C., Pacifici, M. & Fernandez, P. Development of articular cartilage. *Osteoarthr. Cartil.* 21, S2–S3 (2013).
10. Gene Therapy in the Treatment of Knee Disorders Anna L. Stevens, Burhan Gharaibeh, Kurt R. Weiss, Freddie H. Fu and Johnny Huard Insall & Scott Surgery of the Knee, Chapter 4, e18-e48
11. Aigner T, and McKenna L: Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: pp. 5-18
12. KELLGREN JH, LAWRENCE JS. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* 2000;16 (4): 494-502.
13. Cochrane Database Syst Rev. 2006 Jan 25;(1):CD005117.Diacerein for osteoarthritis.Fidelix TS¹, Soares BG, Trevisani VF.
14. Uitterlinden, EJ; Jahr;, H; Koevoet, LM; Jenniskens, M; Bierma-Zeinstra; DeGroot; Verhaar, N; Weinans, N; van Osch, M. Glucosamine decreases expression of anabolic and catabolic genes in human osteoarthritic cartilage explants¹. *OsteoArthritis and Cartilage* (2005)
15. Fenwick SA, Gregg PJ, Rooney P. Osteoarthritic cartilage loses its ability to remain avascular. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:441-52.
16. Smith JO, Orefo ROC, Clarke NMP, Roach HI. Changes in the angiogenic properties of articular cartilage in osteoarthritis. *J Orthop Sci* 2003;8:849-857.

17. Legendre F, Heuze A, Boukerrouche K, Leclercq S, Boumediene K, Galera P, et al. Rhein, the metabolite of diacerhein, reduces the proliferation of osteoarthritic chondrocytes and synoviocytes without inducing apoptosis. *Scand J Rheumatol* [Internet]. 2009 Jan 12 [cited 2017 Oct 22];38(2):104–11. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03009740802421996>
18. Charan, J Khantaria, ND. How to calculate sample size in animal studies. *J PharmacolPharmacother* 2013; 4:303-6.
19. Kikuchi, T.; Sakuta, T. & Yamaguchi, T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthritis Cartilage*. 1998. 6(3):177-86.
20. Hacker SA1, Healey RM, Yoshioka M, Coutts RD. A methodology for the quantitative assessment of articular cartilage histomorphometry. *Osteoarthritis Cartilage*. 1997 Sep;5(5):343-55.
21. Mankin HJ. Current concepts review: The response of articular cartilage to mechanical injury, *J Bone Joint Surg*. 1982;64:460–466.
22. Ajadi, R. A. Otesile, E. B. Kasali, O. B., Short-Term Changes In Lipid Profile Following Experimental Osteoarthritis In Dogs, *Bulgarian Journal Of Veterinary Medicine*; Sep 2012, Vol. 15 Issue 3, P166-171.
23. Blanco-García FJ, Hernández Royo A, Trigueros JA, Gimeno Marques A, Fernández Portal L, Badia Llach X. *Guía De Práctica Clínica En Artrosis De Rodilla*. SER. Madrid: Editorial You&US; 2003.
24. Goranov, N. V, Clinical Changes In Sodium Monoiodoacetate-Induced Stifle Osteoarthritis Model In Dogs. *Veterinary World*; Mar 2012, Vol. 5 Issue 3, P138-144.
25. *Manual Merck De Veterinaria*, Tomo 1, Merial, Eceano, Centrum, Pag. 928-931.
26. Uitterlinden, EJ;Jahr, H; Koevoet, LM; Jenniskens, M;Bierma-Zeinstra;DeGroot; Verhaar, N; Weinans, N;vanOsch, M.Glucosamine decreases expression of anabolic and catabolic genes in human osteoarthritic cartilage

explants1.OsteoArthritis and Cartilage(2005)

27. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, et al. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46: 1769-1772.

28. Panova E, Jones G. Benefit–Risk Assessment of Diacerein in the Treatment of Osteoarthritis. *Drug Saf [Internet]*. 2015 Mar 5 [cited 2017 Oct 18];38(3):24552. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40264-015-0266-z>

Capítulo XII

Resumen Autobiográfico

Como requisito para obtener el grado de
Especialista en Ortopedia y Traumatología

Tesis:

“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE DIACEREÍNA VÍA
INTRAARTICULAR EN UN MODELO DE OSTEOARTROSIS DE
RODILLA”

Campo de estudio: Ciencias de la salud

Datos personales:

Proveniente de H. Matamoros, Tamaulipas; mis padres son Jesús Rivera y Amparo Compeán, con tan solo una hermana de nombre Nubia Rivera. Llegue al estado de Nuevo León a la edad de 17 años buscando abrirme paso en el ambiente médico, a mis 24 años concluí la carrera de Médico Cirujano y Partero y gracias al Servicio Social nacieron mis ganas de elegir mi residencia como especialista en Ortopedia y Traumatología que a su vez he tenido la fortuna de concluir a mis 30 años, misma edad en la que decidí unir mi vida a mi ahora esposa Alejandra Uribe de Rivera. Siguiendo con mis estudios y con la intención de hacer una sub especialidad en Ortopedia Pediátrica, gracias a mi esfuerzo a lo largo de estos años y al apoyo de mis maestros conseguí la entrada al Hospital Shriners para Niños ubicada en la Ciudad de México, donde iniciare mi nueva formación en Marzo del presente año.

Educación:

Egresado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León en la generación 2005-2011, durante el 2012 inicié mi Servicio Social con duración de un año en el Hospital Regional de Alta Especialidad Materno Infantil de Guadalupe, Nuevo León. Participando a lo largo de 1 año en PONSETI. Así mismo en el 2014 comencé mi especialidad en Ortopedia y Traumatología en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” misma que doy por concluida el presente año.

INFORME DE ORIGINALIDAD

46%

INDICE DE SIMILITUD

45%

FUENTES DE INTERNET

9%

PUBLICACIONES

32%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León	24%
	Trabajo del estudiante	

2	eprints.uanl.mx	8%
	Fuente de Internet	

3	www.intjmorphol.com	3%
	Fuente de Internet	

4	hdl.handle.net	2%
	Fuente de Internet	

5	www.researchgate.net	1%
	Fuente de Internet	

6	zaguan.unizar.es	1%
	Fuente de Internet	

7	Norbert Schutze. "Angiogenesis in Osteoarthritis", Current Rheumatology Reviews, 2008	<1%
	Publicación	

8	synapse.koreamed.org	<1%
	Fuente de Internet	



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA Y HOSPITAL UNIVERSITARIO

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina, UANL.
Presente.-

Por medio de la presente me permito enviarle un cordial saludo, así mismo hacer de su conocimiento que el Dr. Carlo Arturo Rivera Campeán, ex residente de esta Especialidad realizó su tesis de manera satisfactoria bajo la dirección del Dr. med. Carlos Alberto Acosta Olivo, Coordinador de Investigación del Servicio.

Así mismo se hace constar que obtuvo el 46% de similitud en la "Plataforma Turnitin".

Sin otro particular por el momento, quedo a sus distinguidas órdenes.

Atentamente
"Alere Flammam Veritatis"
Monterrey, N.L., a 20 de abril del 2021

Dr. med. Santiago de la Garza Castro
Coordinador de Posgrado del Servicio

SERVICIO DE ORTOPEDIA Y TRAUMATOLOGÍA

Av. Francisco I. Madero Pte.s/n. y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro,
C.P. 64460 Monterrey, N.L. Mexico Apartado Postal 1-4469 Tels.: 8347-6698 y 8333-5456
E-mail: serviciotraumatologiahu@gmail.com